

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.05.006

干预气道杯状细胞 CLCA 对 ARDS 小鼠损伤程度及炎症机制的影响 *

郭晓雅 宋立强 梁家宁 杨学敏 陈洁[△]

(空军军医大学西京医院呼吸与危重症医学科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:探讨干预气道杯状细胞 CLCA 的表达与功能,对 ARDS 小鼠肺脏损伤程度的影响,并通过体外细胞研究探讨其机制。**方法:**制备 LPS 诱导的 ARDS 小鼠模型(ARDS 组),并在此模型上分别进行干预,包括气道雾化吸入 CLCA 非特异性阻断剂尼氟灭酸(NFA)(NFA+ARDS 组)、气道滴注 CLCA 特异性抗体(ab-CLCA3)(ab-CLCA3+ARDS 组)。HE 染色观察各组小鼠肺部病理及炎症特征,计算肺损伤评分。运用 hCLCA1-siRNA 抑制人正常支气管上皮细胞系 16HBE 中 hCLCA1 的表达,采用 real-time RT-PCR 法验证抑制效果后,检测各组细胞合成多种炎症因子 mRNA 水平的差异。**结果:**HE 染色显示,ARDS 组与 NFA+ARDS 组相比,肺部病理改变及炎症细胞浸润程度无明显差异,肺损伤评分也没有统计学差异(正常组:2.0±0.71;ARDS 组:6.8±0.45, NFA+ARDS 组 7.4±0.89, P>0.05)。与 ARDS 组相比,ab-CLCA3+ARDS 组肺部病理损伤及炎症细胞浸润程度明显加重,肺损伤评分也升高(正常组:1.8±0.83;ARDS 组:7.6±0.55, ab-mCLCA3+ARDS 组 9.8±0.83, P<0.05)。real-time RT-PCR 检测证实成功构建 hCLCA1 低表达的 16HBE 细胞系,同时 real-time RT-PCR 结果显示 TNF-α 和 IL-1β 的 mRNA 表达水平升高(P<0.05)。**结论:**阻断气道 CLCA 功能区域,可以加重 ARDS 小鼠肺部病理损伤程度及炎症细胞浸润水平,提示气道杯状细胞 CLCA 在 ARDS 小鼠肺部炎症形成过程中发挥抑制性调节作用。

关键词:ARDS;气道上皮杯状细胞;钙激活氯离子通道蛋白

中图分类号:R-33;R563.8 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)05-824-05

Effects of Intervention Airway Goblet Cell CLCA on the Injury Degree and Inflammatory Mechanism of ARDS mice*

GUO Xiao-ya, SONG Li-qiang, LIANG Jia-ning, YANG Xue-min, CHEN Jie[△]

(Department of Respiratory Medicine, Xijing Hospital, Air Force Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of interfering with the expression and function of CLCA in airway goblet cells to the lung injury degree of ARDS mice, and to explore its mechanism through cell research. **Methods:** The lipopolysaccharide (LPS) induced ARDS mice through trachea drip. HE staining was employed to observe pulmonary inflammatory cell infiltration and pathological change of the lung tissue in mice challenged NFA or mCLCA3 antibody. Real-time RT-PCR was used to test the mRNA and the protein expression levels of hCLCA1 in 16-HBE cell lines, which were transfected hCLCA1-Si-RNA. Real-time RT-PCR was used to examine the mRNA expression levels of multiple inflammatory factors. **Results:** HE staining showed that there was no different between NFA mice and control mice in the levels of lung tissue inflammation infiltration (Control group: 2.0±0.71; ARDS group: 6.8±0.45; NFA+ARDS group: 7.4±0.89, P>0.05). However, the infiltration degree of lung tissue inflammation infiltration is more noticeable in mice administrated mCLCA3 antibody than the ARDS group (Control group: 1.8±0.83; ARDS group: 7.6±0.55; ab-mCLCA3+ARDS group: 9.8±0.83, P<0.05). Real-time RT-PCR results confirmed that there was a significant reduce in the mRNA expression levels of hCLCA1 in 16-HBE cell lines transfected hCLCA1-Si-RNA, revealing a successful suppressed of hCLCA1 in 16-HBE cell lines. And Real-time RT-PCR results showed that the mRNA expression levels of TNF-α and IL-1β increased obviously in 16-HBE cell lines (P<0.05). **Conclusions:** The decrease of mCLCA3 can aggravate the lung pathological damage degree and the pulmonary inflammatory response in ARDS mice. These results revealed that CLCA secreted by airway goblet cells inhibit the inflammatory response in the process of ARDS.

Key words: ARDS; Airway goblet cells; CLCA

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R563.8 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)05-825-05

前言

急性呼吸窘迫综合症(Acute respiratory distress syndrome,

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81570072)

作者简介:郭晓雅(1982-),硕士研究生,主治医师,主要研究方向:哮喘及 ARDS 发病机制的研究,

E-mail: guoxiaoya0827@126.com, 电话: 15902989361

△ 通讯作者:陈洁(1979-),本科,主治医师,主要研究方向:ARDS 发病机制的研究, E-mail: 179804610@qq.com, 电话: 18009261680

(收稿日期:2018-09-04 接受日期:2018-09-28)

ARDS)是由多种病因引起的肺内过度性、失控性炎症免疫反应,临床上主要以急性、缺氧性呼吸衰竭为特征,影像学上则以双肺渗出性病变及肺水肿为特征^[1],是重症监护病房(ICU)常见危重病,因病死亡率居高不下(30%~50%)而备受关注^[2]。随着近年来对ARDS的深入研究发现,“炎症是ARDS的本质”这一观点已被大多数学者所认可^[3]。目前认为,中性粒细胞、巨噬细胞及血管内皮细胞等分泌的多种炎性介质的参与是ARDS发病的重要机制之一^[3,4]。因此,控制ARDS发生与发展过程中级联放大的炎症反应是救治该疾病的关键点及难点。近年来研究已经认识到,气道功能障碍是导致ARDS患者肺损伤的一个重要因素^[5],但是气道上皮杯状细胞的角色目前仍研究不足。在外界因子的刺激下,位于气道防御屏障第一线的杯状细胞能迅速分泌粘蛋白,并参与黏液-纤毛清除系统的防御功能^[6];此外,应激状态时还能分泌一种特异性钙激活氯离子通道蛋白(Calcium-activated chloride channel, CLCA)。CLCA在人类和小鼠的基因型分别是hCLCA1和mCLCA3(两者异种同源)。既往多项研究证实,CLCA在哮喘、COPD、肺囊性纤维化等慢性炎症性疾病中表达水平增高,并促进气道黏液高分泌症状的形成,其在这些疾病慢性炎症发生机制中的角色尚在探索之中^[7,8]。那么,阻断该特定CLCA的功能对ARDS起到促进还是抑制作用,是值得探讨的课题。尼氟灭酸(niflumic acid, NFA)是目前欧洲广泛使用的非甾体类抗炎药,也是实验中常用的一种CLCA阻断剂。为此,本研究运用NFA和mCLCA3特异性抗体(ab-mCLCA3)在体干预小鼠,同时抑制HBE细胞系中hCLCA1的表达,旨在观察CLCA与小鼠肺部病理及炎症浸润严重程度及与细胞炎症因子表达水平的关系,从而证实CLCA在ARDS中的作用,为进一步临床干预ARDS提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物与分组 SPF级6-8周雄性C57BL/6小鼠30只,随机分为2部分实验,每部分3组,每组5只,第一部分是正常对照组(Control组)、LPS(10 mg/kg)诱导的(ARDS组)、干预组(NFA-ARDS组);第二部分是正常对照组(Control组)、LPS(10 mg/kg)诱导的(ARDS组)、干预组(ab-mCLCA3-ARDS组)。另外动物购自空军军医大学实验动物中心。

1.1.2 细胞系 本实验使用正常人支气管上皮细胞HBE细胞系,购自ATCC并由实验室培养并保存。

1.1.3 材料试剂 LPS(*Escherichia coli*055:B5)购自Sigma公司;1%戊巴比妥钠购自Sigma公司;生理盐水(saline)购自Sigma公司;尼氟灭酸(NFA)购自Sigma公司;mCLCA3特异性抗体(ab-mCLCA3)购自Abcam公司;DMEM培养基购自GIBCO公司;胎牛血清(FBS)购自GIBCO公司;胰酶购自GIBCO公司;Lipofectamine 2000购自Invitrogen公司;hCLCA1-siRNA购自广州锐博公司;4%多聚甲醛溶液购自Sigma公司;DEPC水购自北京天为时代科技公司;Trizol细胞裂解液购自Invitrogen公司;反转录试剂盒购自TOYOBO公司;SYBR Green Real-time PCR Master购自TOYOBO公司;real-time RT-PCR hCLCA1引物:由Primer5.0软件设计hCLCA1(Gene_ID 1179)上游序列为5-CCTAGTCCTGATGAAACGTC-3;下游序列为:

5-GTTCTCCTATCCACTTCCAC-3,产物长度为103 bp,由上海生工生物工程股份有限公司合成;real-time RT-PCR β -actin引物购自上海生工生物工程股份有限公司;兔抗鼠mCLCA3一抗购自Abcam公司;鼠抗鼠 β -actin一抗购自Abcam公司;山羊抗兔二抗购自Abcam公司;山羊抗鼠二抗购自Abcam公司;蛋白酶抑制剂Cocktail购自Sigma公司;RIPA裂解液购自碧云天公司;Western Blot相关试剂购自碧云天公司;4×Laemmli Sample Buffer购自Bio-Rad公司;Millipore chromogenic kit显影液购自Billerica公司。

1.2 方法

1.2.1 运用尼氟灭酸(NFA)气道雾化小鼠 将15只雄性6-8周龄C57小鼠随机分为三组:对照组(Control组)、LPS刺激组(ARDS组)和干预组(NFA-ARDS组)。给予小鼠腹腔注射1%戊巴比妥钠 Control组小鼠气道滴注saline 50 μ L;ARDS组小鼠气道滴注LPS10 mg/kg,总体积50 μ L;NFA-ARDS组小鼠先气道雾化NFA(20 μ L/mL)半小时,麻醉后气道滴注LPS10 mg/kg,总体积50 μ L。24 h后收取样本。

1.2.2 运用mCLCA3特异性抗体(ab-mCLCA3)气管滴注小鼠 将15只雄性6-8周龄C57小鼠随机分为三组:对照组(Control组)、LPS刺激组(ARDS组)和干预组(ab-mCLCA3-ARDS组)。给予小鼠腹腔注射1%戊巴比妥钠,待其昏迷后Control组小鼠气道滴注saline 50 μ L;ARDS组小鼠气道滴注LPS(10 mg/kg),总体积50 μ L;abCLCA3-ARDS组小鼠先后气道滴注abCLCA3(4 μ L)和LPS(10 mg/kg)。24 h后收取肺组织。

1.2.3 收取小鼠的肺组织 给小鼠腹腔注射麻药后,暴露小鼠胸腔,分离小鼠双肺组织,保存于4%多聚甲醛溶液中,做好标记,用于包埋、切片。

1.2.4 HE染色观察小鼠肺部病理情况,计算肺损伤评分 取左侧肺组织,置于4%多聚甲醛溶液中固定,石蜡包埋切片,经HE切片染色后在显微镜下观察肺部形态。参照Katsuya Mikawa^[11]等的方法以4项指标进行肺损伤半定量评分:肺泡充血;出血;间隙或血管壁中性粒细胞浸润或聚集;肺泡间隔增厚或透明膜形成。0分:极轻度损伤;1分:轻度损伤;2分:中度损伤;3:重度损伤;4分:严重损伤。4项指标得分相加作为总分^[10]。

1.2.5 正常人支气管上皮细胞HBE细胞系培养 本实验使用正常人支气管上皮细胞HBE细胞系,培养于含有10%胎牛血清(FBS)、100 U/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素(双抗)的DMEM培养基中,置于5% CO₂、37℃的孵箱中培养。

1.2.6 hCLCA1-siRNA转染HBE细胞系 实验分为阴性对照组(NC组)、空白对照组(Control组)、转染组(hCLCA1-siRNA组)、刺激组(ARDS组)和转染+刺激组(hCLCA1-siRNA+ARDS组)。将HBE细胞接种于12孔板,用不含抗生素的DMEM培养基培养细胞,待细胞长至80%-90%转染hCLCA1-siRNA。用不含血清的DMEM培养基稀释质粒,加入Lipofectamine 2000,轻轻混匀;在5 min之内将稀释的Lipofectamine 2000分别与hCLCA1-siRNA轻轻混匀,室温静置20 min;将转染试剂混合液分别加入每个孔内,轻摇孔板混匀;37℃的CO₂孵箱里孵育4-6 h,换成含血清DMEM培养基;转染后培养48小时,加或不加LPS处理细胞24 h,收集mRNA与细胞蛋白,低温保存。

1.2.7 real-time RT-PCR 鉴定 hCLCA1 基因是否被特异性抑制
首先提取 HBE 细胞系总 RNA, 检测 HBE 细胞系总 RNA 浓度, 经逆转录后通过实时定量 PCR 检测 hCLCA1 mRNA 水平的表达变化。

1.2.8 real-time RT-PCR 检测炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 的表达
提取 HBE 细胞系总 RNA, 检测 HBE 细胞系总 RNA 浓度, 经逆转录后通过实时定量 PCR 检测炎症因子 TNF- α 、IL-1 β mRNA 水平的表达变化。

1.3 统计学分析

统计学处理采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计学处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 t 检验, 不同组间比较采

用单因素方差分析。P<0.05 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HE 染色观察 NFA 气道雾化小鼠的肺部病理及肺损伤评分

小鼠肺部 HE 染色切片镜下观察显示: 对照组小鼠肺部结构清楚; ARDS 组小鼠肺组织正常结构被破坏, 肺泡上皮弥漫性损伤, 肺间质出血伴有大量的炎性细胞浸润, 肺损伤评分明显升高。给予 NFA 雾化后小鼠肺部病理与 ARDS 组小鼠大致相同, 肉眼上无明显变化; 两组的肺损伤评分无统计学差异 (Control 组: 2.0 ± 0.71 ; ARDS 组: 6.8 ± 0.45 , NFA+ARDS 组: 7.4 ± 0.89 , $P>0.05$) (图 1)。

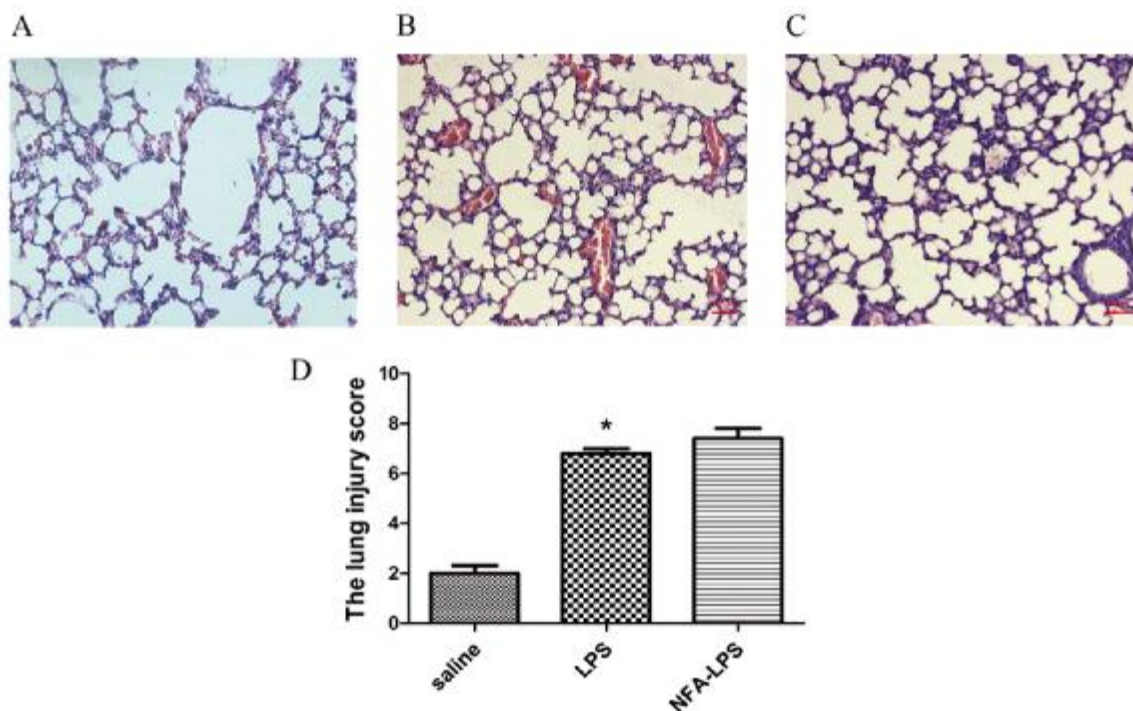


图 1 HE 染色观察小鼠肺部病理情况及肺损伤评分情况 (A: Control 组; B: ARDS 组; C: NFA+LPS 组; D: 肺损伤评分)。HE 染色显示三组之间的形态学基本一致, LPS 刺激组和 NFA 干预组的小鼠肺损伤评分无统计学差异 (Control 组: 2.0 ± 0.71 ; ARDS 组: 6.8 ± 0.45 , NFA+LPS 组: 7.4 ± 0.89 , $P>0.05$)。

Fig.1 HE staining was used to observe the pulmonary pathology and lung injury score of mice (A: Control group; B: ARDS group; C: NFA+LPS group; D: lung injury score). HE staining showed that there was no different between NFA mice and control mice in the levels of lung tissue inflammation infiltration (Normal group: 2.0 ± 0.71 ; ARDS group: 6.8 ± 0.45 ; NFA+ARDS group: 7.4 ± 0.89 , $P>0.05$).

2.2 HE 染色观察 ab-mCLCA3 气道滴注小鼠肺部病理及肺损伤评分

小鼠肺部 HE 染色切片镜下观察显示: 对照组小鼠肺部结构清楚; ARDS 组小鼠肺组织正常结构被破坏, 肺泡上皮弥漫性损伤, 肺间质出血伴有大量的炎性细胞浸润, 肺损伤评分升高。给予 ab-mCLCA3 后的小鼠肺部炎症因子浸润更加重, 肺损伤评分更高 (Control 组: 1.8 ± 0.83 ; ARDS 组: 7.6 ± 0.55 , ab-mCLCA3+ARDS 组: 9.8 ± 0.83 , $P<0.05$) (图 2)。

2.3 从 mRNA 分子水平鉴定 hCLCA1 基因是否被特异性抑制

real-time RT-PCR 对细胞内 hCLCA1 基因表达检测, 扩增结果显示: 转染 hCLCA1-siRNA 后, HBE 细胞系中, hCLCA1 的 mRNA 表达水平低于 NC 组 ($P<0.05$)。hCLCA1 基因的表达明显受到抑制, hCLCA1-siRNA 对目的基因的抑制效率达到

70%以上 (图 3)。

2.4 real-time RT-PCR 检测 HBE 细胞系中炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 的表达情况

real-time RT-PCR 对细胞内 TNF- α 和 IL-1 β 基因表达检测 (图 4), 扩增结果显示: ARDS 组细胞中的 TNF- α 和 IL-1 β 的 mRNA 表达水平明显高于 Control 组, hCLCA1-siRNA+ARDS 组细胞中的 TNF- α 和 IL-1 β 的 mRNA 表达水平均明显高于 ARDS 组细胞 ($P<0.05$)。

3 讨论

急性呼吸窘迫综合症 (Acute respiratory distress syndrome, ARDS) 是一种急性、弥漫性、炎症性肺损伤, ARDS 的发病率仍居高不下, 关键原因是其发病机制仍未完全阐明。无论是直接

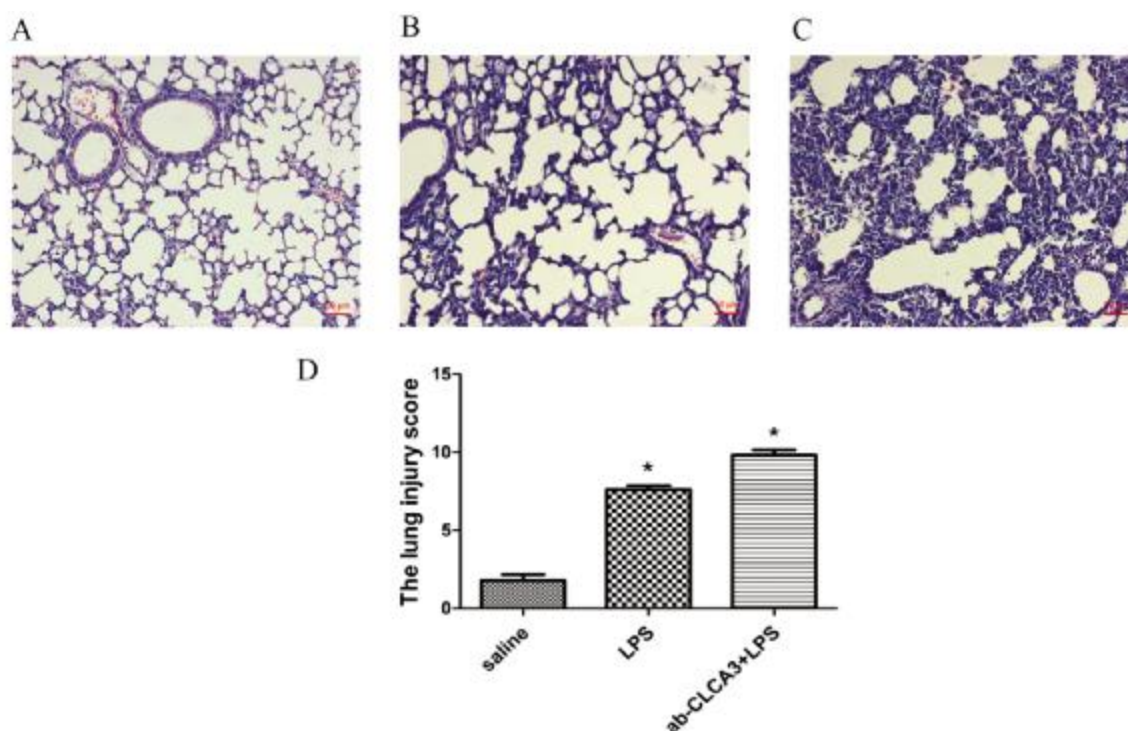


图2 HE 染色观察小鼠肺部病理情况 (A: Control 组; B: ARDS 组; C: ab-mCLCA3+LPS 组; D: 肺损伤评分)。HE 染色显示给予抗体后小鼠肺部损伤更加明显,炎症因子浸润更加明显。肺损伤评分结果显示 ab-mCLCA3 干预组小鼠比 LPS 刺激组小鼠明显升高 (Control 组: 1.8 ± 0.83 ; ARDS 组: 7.6 ± 0.55 , ab-mCLCA3+LPS 组 9.8 ± 0.83 , $P < 0.05$)。

Fig.2 HE staining was used to observe the pulmonary pathology in mice (A: Control group; B: ARDS group; C: ab-mCLCA3 +LPS group; D: lung injury score). HE staining showed that infiltration degree of lung tissue inflammation infiltration is more noticeable in mice administrated mCLCA3 antibody than the control mice. The infiltration degree of lung tissue inflammation infiltration is more noticeable in mice administrated mCLCA3 antibody than the ARDS group (Control group: 1.8 ± 0.83 ; ARDS group: 7.6 ± 0.55 ; ab-mCLCA3+ARDS group: 9.8 ± 0.83 , $P < 0.05$).

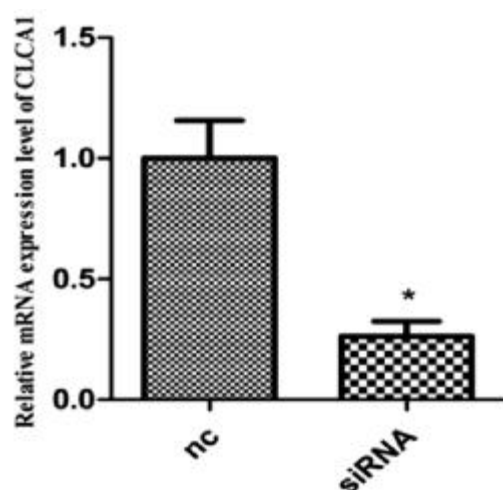


图3 real-time RT-PCR 检测细胞内 hCLCA1 基因表达的情况。转染 hCLCA1-siRNA 后, HBE 细胞系中 hCLCA1 的 mRNA 表达水平低于 NC 组 ($P < 0.05$)

Fig.3 Real-time RT-PCR results confirmed that there was a significant reduce in the mRNA expression levels of hCLCA1 in 16-HBE cell lines transfected hCLCA1-Si-RNA ($P < 0.05$)

性还是间接性肺部损伤引起的 ARDS,炎症反应始终贯穿整个 ARDS 发展过程,由免疫细胞释放的大量炎症因子是介导肺部炎症反应的关键^[2]。虽然 ARDS 炎症风暴的启动机制仍不甚清楚,但普遍认同中性粒细胞是引发 ARDS 病理生理改变的关键

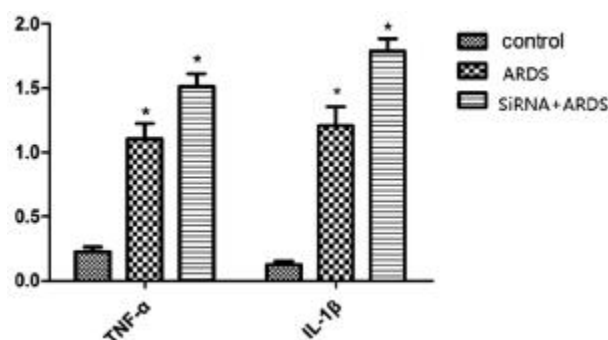


图4 real-time RT-PCR 检测细胞内 TNF-α 和 IL-1β 基因的表达情况。细胞转染后 TNF-α 和 IL-1β 的 mRNA 表达水平均明显升高 ($P < 0.05$)

Fig.4 Real-time RT-PCR results showed that the mRNA expression levels of TNF-α and IL-1β increased obviously in 16-HBE cell lines ($P < 0.05$)

细胞。中性粒细胞从血管迁移到肺泡间质和肺泡腔,是 ARDS 启动的必要条件,需要在 CXCL 等趋化因子辅助下完成。过度激活的中性粒细胞大量释放超氧化物、弹性蛋白酶和花生四烯酸类代谢产物,直接及间接损伤肺泡上皮细胞及肺泡毛细血管内皮细胞。同时肺泡与肺间质内积聚富含蛋白、多种炎症细胞的超量水肿液,肺表面活性物质减少,引起肺不张,肺内分流增加,加重低氧血症。临床研究证实,ARDS 患者 BALF 中性粒细胞的数量与病症的严重程度呈正比。耗尽中性粒细胞或阻断中性粒细胞的趋化因子,可以明显减轻 ARDS^[12,13]。气道上皮细胞是重要的肺脏结构细胞,直接与外界环境接触,是肺脏的第一

道防御屏障。越来越多的证据表明,气道上皮细胞不是单纯的物理屏障,在受到病原体、烟雾或过敏原等刺激时,能分泌多种细胞因子及炎性介质(包括 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-11、GM-CSF 和 EGF 等),启动和调控肺部炎症性病变的发生与发展^[6]。目前气道上皮细胞在 ARDS 发生中的地位,还不甚清楚。其中,气道上皮中杯状细胞的角色日益受到关注。在外界因子刺激下,它参与反应迅速的黏液-纤毛清除系统工作,应激发状态下还能“旁分泌”一种特异性钙激活 Cl⁻ 通道蛋白(Calcium-activated chloride channel, CLCA)。最初认为 CLCA 是跨膜蛋白,目前确认 CLCA 是分泌型蛋白,其裂解的 N 端肽段对 Cl⁻ 通道具有调节作用,能调节黏液蛋白的合成^[14,15]。CLCA 在哮喘、COPD 等慢性炎症性疾病中高度活跃,能促进气道黏液高分泌症状的形成,其在这些疾病慢性炎症发生中的角色逐渐被人们关注。近年来,很多研究结果均揭示 CLCA 除了能够调节杯状细胞增生与气道黏液的分泌,还能够在机体的固有免疫应答中抑制组织炎症反应^[16-19]。

在本实验研究中,我们试图观察 CLCA 的降低与炎症因子浸润严重程度的关系,从而得出 CLCA 在 ARDS 中发挥的是促炎作用还是抑制炎症而保护肺部的作用。尼氟灭酸(NFA)是目前欧洲广泛使用的非甾体类抗炎药,也是目前实验中常用的一种 CLCA 阻断剂^[20]。在本实验研究中,与对照组小鼠相比,NFA 气道雾化小鼠的肺部炎症病理情况并没有明显差异。而给予特异性 mCLCA3 抗体(ab-mCLCA3)后,小鼠肺部炎症因子浸润明显加重,肺损伤评分明显升高。分析其可能原因是,既往早期功能研究显示,CLCA 为跨膜氯离子通道蛋白,而后期结构研究确认 CLCA 为气道上皮杯状细胞旁分泌型蛋白,其作为一种生物媒介可以作用于多种细胞(包括炎症细胞和结构细胞)^[14,15]。其中包括能通过某种机制(如调控 Cl⁻ 离子通道的开闭,以及下游 MAPK、NF- κ B 等途径)作用于巨噬细胞等免疫呈呈细胞,从而调控这些细胞合成和分泌炎症趋化相关因子,最终调控中性粒细胞的聚集程度^[21,22]。NFA 直接阻断氯离子通道,不能减少杯状细胞,对炎症细胞的产生和分泌并无任何影响,而给予 ab-mCLCA3 抗体后,从源头干预了 CLCA,从而调控炎症因子的合成和分泌,导致肺部炎症因子浸润加重,肺损伤评分升高,而 CLCA 分泌出来后作用于上皮细胞的通路及机制目前尚不清楚。由此,我们推测 CLCA 在 ARDS 的发病过程中可能会起到抑制炎症发展的作用,CLCA 的分泌不足会加重 ARDS 的炎症病理反应。这一推测在进一步的细胞实验中也得到证实,我们将特异性下调人 hCLCA1 表达的 siRNA 质粒转染至正常人支气管上皮细胞 HBE 细胞系中,观察到特异性降低 hCLCA1 的表达后,可提高 HBE 细胞的炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 的 mRNA 表达水平。这与体内干预研究的结果一致,进一步证实了 CLCA 在 ARDS 的发病过程中起到抑制炎症发展的作用。

综上所述,我们通过体内体外研究直接阻断气道 CLCA 功能可以加重 ARDS 小鼠肺部病理损伤程度及炎症细胞浸润水平,降低上皮细胞合成 TNF- α 和 IL-1 β 是降低肺泡损伤水平的机制之一,提示气道杯状细胞 CLCA 在 ARDS 小鼠肺部炎症形成过程中发挥抑制性调节作用,此结论还需要更多的动物实验进一步验证。这为进一步阐明 ARDS 的炎症形成机制提供新

的理论基础。

参考文献(References)

- [1] 何流漾, 郑建洲, 夏蕾, 等. 炎症反应在 ARDS 中的作用机制研究进展[J]. 中华危重病急救医学, 2017, 29(07): 651-655
- [2] Bellani G, Laffey JG, Pham T, et al. Epidemiology, Patterns of Care, and Mortality for Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome in Intensive Care Units in 50 Countries [J]. JAMA, 2016, 315(8): 788-800
- [3] Weiss DJ. Cell therapies for ARDS: a promising start[J]. Lancet Respir Med, 2015, 3(1): 2-3
- [4] Koh Y. Update in acute respiratory distress syndrome [R]. J Intensive Care, 2014, 2(1): 2-8
- [5] Piresneto RC, Morales MM, Lancas T, et al. Expression of acute-phase cytokines, surfactant proteins, and epithelial apoptosis in small airways of human acute respiratory distress syndrome [J]. J Crit Care, 2013, 28(1): 111.e9-111.e.15
- [6] Proud D, Leigh R. Epithelial cells and airway diseases [J]. Immunol Rev, 2011, 242 (1): 186-204
- [7] Kamada F, Suzuki Y, Shao C, et al. Association of the hCLCA1 gene with childhood and adult asthma [J]. Genes Immun, 2004, 5 (7): 540-547
- [8] Hegab AE, Sakamoto T, Uchida Y, et al. CLCA1 gene polymorphisms in chronic obstructive pulmonary disease [J]. J Med Genet, 2004, 41 (3): e27
- [9] Hauber HP, Lavigne F, Hung HL, et al. Effect of Th2 type cytokines on hCLCA1 and mucus expression in cystic fibrosis airways [J]. J Cyst Fibros, 2010, 9(4): 277-279
- [10] 梁家宁, 周倩倩, 张天相, 等. CXCL1 和 CXCL2 在 ARDS 小鼠肺组织表达的变化规律及评价 [J]. 国际呼吸杂志, 2017, 37(08): 600-604
- [11] Mikawa, K, K Nishina, Y Takao, et al. ONO-1714, a nitric oxide synthase inhibitor, attenuates endotoxin-induced acute lung injury in rabbits[J]. Anesth Analg, 2003, 97(6): 1751-1755
- [12] Grommes J, Soehnlein O. Contribution of neutrophils to acute lung injury[J]. Mol Med, 2011, 17(3-4): 293-307
- [13] Manicone AM. Role of the pulmonary epithelium and inflammatory signals in acute lung injury [J]. Expert Rev Clin Immunol, 2009, 5(1): 63-75
- [14] Mundhenk L, Alfalah M, Elble RC, et al. Both cleavage products of the mCLCA3 protein are secreted soluble proteins [J]. J Biol Chem, 2006, 281(40): 30072-30080
- [15] Bothe MK, Mundhenk L, Kaup M, et al. The murine goblet cell protein mCLCA3 is a zinc-dependent metalloprotease with autoproteolytic activity[J]. Mol Cells, 2011, 32(6): 535-541
- [16] Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody E, et al. Incidence and outcomes of acute lung injury[J]. N Engl J Med, 2005, 353(16): 1685-1693
- [17] Sala-Rabanal M, Yurtsever Z, Berry KN, et al. Novel Roles for Chloride Channels, Exchangers, and Regulators in Chronic Inflammatory Airway Diseases[J]. Mediators Inflamm, 2015, 2015: 497387
- [18] Hauber, HP, T Goldmann, E Vollmer, et al. LPS-induced mucin expression in human sinus mucosa can be attenuated by hCLCA inhibitors[J]. J Endotoxin Res, 2007, 13(2): 109-116 (下转第 923 页)
- [19] Long, AJ, JP Sypek, R Askew, et al. Gob-5 contributes to goblet cell

(上接第 828 页)

- PCI 术后支架内血栓形成的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2018, 26 (3): 291-294
- [9] 魏兴海. 第五届全国脑血管病学术会议简介[J]. 现代康复, 2000, 4 (3): 357
- [10] Zhao XJ, Li QX, Liu TJ, et al. Predictive values of CSS and NIHSS in the prognosis of patients with acute cerebral infarction: A comparative analysis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2018, 97(39): e12419
- [11] Tang SC, Luo CJ, Zhang KH, et al. Effects of dl-3-n-butylphthalide on serum VEGF and bFGF levels in acute cerebral infarction [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(19): 4431-4436
- [12] Meng X, Wen R, Li X. Values of serum LDL and PCT levels in evaluating the condition and prognosis of acute cerebral infarction[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(4): 3065-3069
- [13] Ke Z, Zhao Y, Wang C, et al. The alliance with expanding blood volume and correcting anemia is an effective therapeutic measure for the adult anemia patients of acute cerebral infarction [J]. *Int J Neurosci*, 2018, 128(5): 429-434
- [14] Zhou H, Yang J, Zhang C, et al. Safflower polysaccharide inhibits the development of tongue squamous cell carcinoma [J]. *World J Surg Oncol*, 2018, 16(1): 167
- [15] Delshad E, Yousefi M, Sasannezhad P, et al. Medical uses of *Carthamus tinctorius* L. (Safflower): a comprehensive review from Traditional Medicine to Modern Medicine [J]. *Electron Physician*, 2018, 10(4): 6672-6681
- [16] Chen B, Wang HT, Yu B, et al. Carthamin yellow inhibits matrix degradation and inflammation induced by LPS in the intervertebral disc via suppression of MAPK pathway activation[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(2): 1614-1620
- [17] Watanabe K, Tanaka M, Yuki S, et al. How is edaravone effective against acute ischemic stroke and amyotrophic lateral sclerosis?[J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2018, 62(1): 20-38
- [18] Wang R, Wei Y, Teng J. Levels of Plasma N-terminal Pro-brain Natriuretic Peptide and D-dimer on the Prognosis of Patients with Acute Cerebral Infarction[J]. *Pak J Med Sci*, 2018, 34(4): 855-858
- [19] 杨云芳,白雪,杨思进,等. 中医非药物治疗脑梗死急性期的临床研究[J]. *中国中医急症*, 2018, 27(1): 64-65, 85
- [20] 梁建, 刘国华, 李水桥, 等. 红花黄色素联合依达拉奉治疗急性脑梗死临床观察[J]. *西部中医药*, 2014, (3): 105-106, 107
- [21] Zhou D, Qu Z, Wang H, et al. The effect of hydroxy safflower yellow A on coronary heart disease through Bcl-2/Bax and PPAR- γ [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(1): 520-526
- [22] Wood CC, Okada S, Taylor MC, et al. Seed-specific RNAi in safflower generates a superhigh oleic oil with extended oxidative stability [J]. *Plant Biotechnol J*, 2018, 16(10): 1788-1796
- [23] Sun YY, Li Y, Wali B, et al. Prophylactic Edaravone Prevents Transient Hypoxic-Ischemic Brain Injury: Implications for Perioperative Neuroprotection[J]. *Stroke*, 2015, 46(7): 1947-1955
- [24] Chen Y, Zhao Y. Curative efficacy of penicyclidine combined with edaravone on acute cerebral infarction and their effects on serum TNF- α and NDS score in rats [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(1): 223-228
- [25] Wan JL, Ma ZW. The Value of Mean Platelet Volume for Prognosis of Patients with Acute Cerebral Infarction[J]. *Clin Lab*, 2017, 63(11): 1801-1807
- [26] Cao B, Chai C, Zhao S. Protective effect of Edaravone against hypoxia-induced cytotoxicity in osteoblasts MC3T3-E1 cells[J]. *IUBMB Life*, 2015, 67(12): 928-933
- [27] Ikeda K, Iwasaki Y. Edaravone, a Free Radical Scavenger, Delayed Symptomatic and Pathological Progression of Motor Neuron Disease in the Wobbler Mouse[J]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0140316
- [28] Xuan J, Huang M, Lu Y, et al. Economic Evaluation of Safflower Yellow Injection for the Treatment of Patients with Stable Angina Pectoris in China: A Cost-Effectiveness Analysis[J]. *J Altern Complement Med*, 2018, 24(6): 564-569
- [29] 张宏宇,陈沫,熊文激,等. 红花黄色素抗血栓和降血脂作用的实验研究[J]. *中国实验诊断学*, 2010, 14(7): 1028-1031
- [30] 江恒,郭广波,黄彦,等. 红花黄色素注射液对卧床患者血液流变学的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2015, 31(6): 450-452

hyperplasia and modulates pulmonary tissue inflammation [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2006, 35(3): 357-365

- [20] 宋立强, 李妍, 张乐宁, 等. 尼氟灭酸对支气管哮喘小鼠模型气道高反应性的抑制作用 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2004, 27(2): 108-111
- [21] Patel AC, Brett TJ, Holtzman MJ. The role of CLCA proteins in in-

flammatory airway disease [J]. *Annu Rev Physiol*, 2009, 71: 425-449

- [22] Hoshino M, Morita S, Iwashita H, et al. Increased expression of the human Ca^{2+} -activated Cl^- channel 1 (CaCC1) gene in the asthmatic airway [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002, 165(8): 1132-1136